

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover
(Direktor: Prof. Dr. med. vet. Dr. med. h. c. K. Wagener)

Methoden zur Verbesserung des biologischen Schwangerschaftsnachweises

Von Lisa Hensel

Die von Aschheim und Zondek (1928) ausgearbeitete Methodik eines biologischen Schwangerschaftsfrühnachweises führte zur Entwicklung weiterer Techniken, die neben der erreichten Sicherheit eine Verkürzung der Untersuchungszeit zum Ziele hatten. Dabei wurden vor allem andere Versuchstiere als Mäuse und Kaninchen auf ihre Brauchbarkeit geprüft.

Im Jahre 1930 beobachtete Hogben, daß Amphibien auf die ihnen parenteral mit dem Harn schwangerer Frauen verabreichten sogenannten Schwangerschaftshormone sichtbar reagierten. Die Untersuchungen führte er mit dem weiblichen südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis* Daud) aus.

Galli-Mainini (1947) erzielte gute Ergebnisse mit der männlichen südamerikanischen Kröte (*Bufo arenarum* Hensel), während Brody (1949) mit dem männlichen nordamerikanischen Frosch (*Rana pipiens*) Schwangerschaftshormone nachweisen konnte. Nach den Arbeiten von Biernacka und Pignon (1948), Paul (1949) sowie Bickenbach und Paul (1950), Grote (1951) und Lutz (1955) war von den europäischen Amphibien besonders der männliche Wasserfrosch (*Rana esculenta*) als Versuchstier geeignet, während der weibliche Wasserfrosch sowie der männliche Grasfrosch (*Rana temporaria*) sich als unbrauchbar erwiesen. Manstein und Schmidt-Hoensdorf (1949) sowie Lilie und Hartleb (1949), Schmidt-Elmendorff und Maschke (1951) und Müller (1951) berichteten über ebenso gute Erfolge mit der einheimischen männlichen Erdkröte (*Bufo vulgaris*).

Bei den im hiesigen Institut ausgeführten biologischen Schwangerschaftsuntersuchungen wird wegen der leichten Beschaffung und Haltung, der Anspruchslosigkeit und der Möglichkeit der Wiederverwendung die einheimische Erdkröte (*Bufo vulgaris*) als Versuchstier verwendet. Bei dieser Tierart kommt als weiterer Vorteil gegenüber den anderen Amphibien hinzu, daß die Untersuchungszeit nur 3 bis 5 Stunden beträgt. Es fragt sich jedoch, ob gegenüber diesen Vorteilen der Krötentest die gleiche diagnostische Sicherheit bietet wie die Aschheim-Zondek-Reaktion.

Zur Prüfung dieser Frage wurden in den letzten Jahren vergleichend biologische Schwangerschaftsuntersuchungen mit Harnproben ausgeführt. Alle Proben wurden mittels der Aschheim-Zondek-Reaktion und dem Krötentest vergleichend geprüft. Reagierte die Harnprobe bereits im Krötentest positiv, wurde auf die Ausführung der Aschheim-Zondek-Reaktion verzichtet, da nach den hiesigen Erfahrungen dann in jedem Fall die Aschheim-Zondek-Reaktion positiv ausfällt. Bei einem negativen Krötentest wurde dagegen anschließend zur Kontrolle die Aschheim-Zondek-Reaktion eingeleitet.

Vergleich der Aschheim-Zondek-Reaktion mit dem Krötentest

Für eine Untersuchung wurden jeweils drei Kröten verwendet, deren vor Versuchsbeginn entnommene Kloakenflüssigkeit mikroskopisch auf Spermienfreiheit im Nativpräparat bei fünfzigfacher Vergrößerung geprüft wurde.

Nach einer Filtration des auf Schwangerschaftshormone zu untersuchenden Harns durch Filtrierpapier wurde dessen pH-Wert mittels

Indikatorpapier bestimmt und, falls erforderlich, mit Essigsäure auf pH 6,6—6,8 eingestellt. Davon wurden je einer Kröte 1,5 ccm subkutan in den dorsalen Lymphsack injiziert. Während der vierstündigen Beobachtungsdauer verblieben die Tiere in Glasgefäßen bei Zimmertemperatur. Da die Amphibien ihren Feuchtigkeitsbedarf durch die Haut decken (Jung), wurde in jedes Glas soviel Wasser gegeben, daß der Boden gerade bedeckt war. Nach Beendigung der Beobachtungszeit wurde der Kloakeninhalt der Kröten wiederum mikroskopisch im Nativpräparat auf die Anwesenheit von Spermien geprüft. Sofern auch nur bei einem der drei Versuchstiere bewegliche Spermien zahlreich nachweisbar waren, wurde der Krötentest positiv gewertet. War dagegen bei allen drei Tieren keine Spermatorrhoe erfolgt, wurde zur weiteren Kontrolle die Aschheim-Zondek-Reaktion angesetzt. Hierzu dienten als Versuchstiere vier etwa 8 bis 10 g schwere infantile weibliche Mäuse. Je zwei Tieren wurden 0,4 ccm und je einem Tier 0,3 und 0,2 ccm Harn subkutan dorsal unter die Thoraxhaut injiziert, und zwar jeweils an zwei aufeinanderfolgenden Tagen um 8, 11 und 15 Uhr. Am vierten Untersuchungstag wurden die Mäuse getötet und ihre Ovarien im Quetschpräparat mikroskopisch mit schwachem Trockensystem untersucht. Als sicheres Kriterium einer positiven Aschheim-Zondek-Reaktion galt der eindeutige Nachweis eines oder mehrerer Corpora lutea.

Bei diesem Untersuchungsgang, in dem nach einem negativen Ausfall des Krötentests zur weiteren Prüfung die Aschheim-Zondek-Reaktion eingeleitet wurde, wurden die in der nachstehenden Tabelle 1 zusammengefaßten Ergebnisse erzielt.

Tab. 1. Vergleich des negativen Krötentests mit der Aschheim-Zondek-Reaktion

Jahr	Zahl der untersuchten Harnproben	Krötentest negativ	davon bei Aschheim-Zondek-Reaktion	
			positiv	negativ
1957	676	446	77 (17,3%)	369
1958	713	461	92 (19,9%)	369
1959	724	446	41 (9,14%)	405
Ges. Zahl	2113	1353	210 (15,5%)	1143

Aus dieser Aufstellung wird ersichtlich, daß von den 2113 ausgeführten Untersuchungen im Krötentest 1353 Proben negativ reagierten. Von diesen negativ reagierenden Harnproben konnten jedoch durch die Aschheim-Zondek-Reaktion noch weitere 210 Proben (15,5%) als positiv ermittelt werden.

Die Überprüfung des negativen Krötentests durch die Aschheim-Zondek-Reaktion hat somit in Übereinstimmung mit anderen Autoren wie Petzold (1942), Lilie und Hartleb (1949), Grote (1951), Klopfer und Frank (1949) u. a. ergeben, daß die durch die Verwendung von Amphibienarten erzielbare verkürzte Untersuchungsdauer auf Kosten der Sicherheit des Ergebnisses erreicht wird; mit anderen Worten: Die als Versuchstiere bei der Aschheim-Zondek-Reaktion verwandten Mäuse reagieren empfindlicher auf die im Harn befindlichen Schwangerschaftshormone als die Erdkröte. Nach diesen Ergebnissen kann bei der hormonalen Schwangerschaftsunter-

suchung bei negativem Krötentest auf die Aschheim-Zondek-Reaktion nicht verzichtet werden.

Da aber Material und Arbeitsaufwand bei der Aschheim-Zondek-Reaktion nicht unerheblich größer und vor allem aber die relativ lange Untersuchungsdauer in manchen klinischen Fällen nicht tragbar erscheint, ist versucht worden, die diagnostische Sicherheit des Krötentests durch Konzentration der Schwangerschaftshormone in den zu untersuchenden Harnproben unter gleichzeitiger Entgiftung (nach Zondek, Brody, Culter und Oobatake) zu erhöhen. Bei solchen Bemühungen gelangen den japanischen Forschern Nishijima, Aya, Ishida, Shimada, Najima und Uemura (1957) mittels der von Culter angegebenen besonderen Präparation des Harns Schwangerschaftsnachweise durch den Krötentest mit einer durch klinische Befunde bestätigten Sicherheit von 99,47%. Als Versuchstiere diente ihnen der japanische Frosch (*Rana nigromaculata* Hallowell).

In Anbetracht der oben angeführten Vorteile des Krötentests erschien es auch im Rahmen meiner Untersuchungen geboten, die von den japanischen Wissenschaftlern angewandte Technik zu überprüfen. Allerdings stand hierfür nur die einheimische Erdkröte (*Bufo vulgaris*) zur Verfügung.

Vergleichende Untersuchung von nativem und vorbehandeltem Harn

Präparation des Harns nach Culter

Der pH-Wert von 100 ccm Morgenurin wird mit einer 20prozentigen Salzsäurelösung unter Verwendung einer 0,04prozentigen Bromkresolgrünlösung als Indikator auf pH 4,0 eingestellt. Mit 5 ccm einer 20prozentigen wäßrigen Bolus alba-Suspension wird der Harn gut durchgemischt. Danach läßt man die Bolus alba sedimentieren, bis der Bodensatz etwa 15–20 ccm beträgt. Die darüber stehende Flüssigkeit wird abgossen und der Bodensatz 5 Minuten bei 3 000 Touren zentrifugiert. Die klare Flüssigkeit wird dekantiert und zu dem Bodensatz werden 5 ccm einer n/1 Natronlauge gegeben. Nach gründlicher Durchmischung wird abermals bis zur vollständigen Klärung zentrifugiert. Anschließend wird der erforderliche pH-Wert unter Verwendung einer 0,5prozentigen alkoholischen Phenolphthaleinlösung als Indikator durch Hinzufügen einer 20prozentigen Salzsäurelösung bis zur Entfärbung eingestellt. Die Präparation erfordert ca. 30–35 Minuten.

Von diesem auf ein Zwanzigstel seines Volumens eingeeengten Patientenharns werden je zwei Kröten, deren Kloakeninhalt vor Versuchsbeginn mikroskopisch auf Spermienfreiheit geprüft war, je 2 ccm in den dorsalen Lympfsack injiziert. Die Tiere werden während der Beobachtungsdauer von 4 Stunden in der vorher angeführten Weise gehalten.

So wurden 136 Harnproben im unbehandelten wie auch nach vorstehender Methode vorbehandeltem Zustand mit dem Krötentest untersucht. Zur Kontrolle wurden dieselben Proben unvorbehandelt mit der Aschheim-Zondek-Reaktion geprüft.

Die Untersuchungen führten zu den in nachfolgender Tabelle 2 dargestellten Ergebnissen.

Bei den 136 vergleichend ausgeführten Untersuchungen konnten somit im Krötentest mit nativem Harn in 42 Proben, mit konzentriertem Harn dagegen in 45 Proben Schwangerschaftshormone nachgewiesen werden. In vorbehandeltem Harn läßt sich somit eine Erhöhung der positiven Reaktionen um 2,2% erzielen. Zieht man aber die Ergebnisse der Aschheim-Zondek-Reaktion, durchgeführt mit unvorbehandelten Proben, zum Vergleich heran, so ergibt sich, daß noch in weiteren 10 Proben (7,3%) Schwangerschaftshormone nachgewiesen werden konnten gegenüber den vorbehandelten.

Dazu muß bemerkt werden, daß bei den verschiedenen Untersuchungsmethoden — Krötentest mit vorbehandeltem und unvorbehandeltem Harn sowie Aschheim-Zondek-Reaktion mit unvorbehandeltem Harn — stets in denselben Proben Schwangerschaftshormone nachgewiesen wurden; das bedeutet, daß alle durch die Aschheim-Zondek-Reaktion als negativ ermittelten Proben auch sämtlich im Krötentest negativ waren. Die wesentlich besseren Ergebnisse der japanischen Autoren waren durch die hiesigen Untersuchungen nicht zu erreichen. Die unterschiedlichen Resultate sind vielleicht mit der Verwendung verschiedener Versuchstiere, der japanische Frosch und die europäische Erdkröte, zu erklären.

Die beschriebenen Untersuchungen haben somit gezeigt, daß durch die Konzentration des Harns nach Culter sich der Nachweis der Schwangerschaftshormone im Krötentest um 2,2% steigern läßt. Die Vorbehandlung des Harns, die einfach ausführbar ist und nicht mehr als 30–35 Minuten an Zeitaufwand erfordert, ist zweifellos vorteilhaft. Andererseits ist ersichtlich, daß der Krötentest weder mit unvorbehandeltem noch vorbehandeltem Harn die diagnostische Leistung der Aschheim-Zondek-Reaktion erreicht.

Bei Vornahme von biologischen Schwangerschaftsuntersuchungen empfiehlt sich daher die Anstellung des Krötentests mit konzentriertem Harn. Bei negativem Ausfall sollte aber in jedem Fall zusätzlich die Aschheim-Zondek-Reaktion eingeleitet werden, da damit die Zahl der positiven Reaktionen um 7,3% erhöht werden kann.

Zusammenfassung

Durch vergleichende Untersuchungen der Aschheim-Zondek-Reaktion mit dem Krötentest an insgesamt 2 113 Harnproben konnte mit der Aschheim-Zondek-Reaktion 15,5% mehr positive Reaktionen als mit dem Krötentest erzielt werden. Vergleichend wurden im Krötentest und der Aschheim-Zondek-Reaktion 136 unvorbehandelte und gleichzeitig nach Culter vorbehandelte Harnproben untersucht. Durch die Vorbehandlung des Harns wurde eine um 2,2% höher liegende diagnostische Sicherheit des Krötentests erreicht. Bei den gleichzeitig mit unvorbehandeltem Harn durchgeführten Aschheim-Zondek-Reaktionen wurden 7,3% mehr positive Reaktionen gegenüber den mit vorbehandeltem Harn ausgeführten Krötentests ermittelt. Bei negativem Ausfall des Krötentests kann somit auf die Vornahme der Aschheim-Zondek-Reaktion nicht verzichtet werden.

Schrifttum

- (1) Aschheim, S., B. Zondek: *Klin. Wschr.* 7 (1928), 1404.
- (2) Bickenbach, W.: *Zbl. Gyn.* 69 (1947), 32.
- (3) Bickenbach, W., H. Paul: *Klin. Wschr.* 28 (1950), 79.
- (4) Biernacka, J., A. Pignon: *Przegl. lek.* (1949), 482; zit. H. Grote: *Diss. Hannover* 1960 (8)
- (5) Brody, H.: *Amer. J. Obstet. Gynec.* 57 (1949), 581.
- (6) Culter, J. N.: *J. Lab. clin. Med.* 34 (1949), 554.
- (7) Galli-Mainini, C.: *J. Amer. med. Ass.* 138 (1947), 121.
- (8) Grote, H.: *Diss. Hannover* 1951.
- (9) Hogben, L. T.: *Proc. Roy. Soc. S. Afr. March*, 1930. Zit. n. G. Petzold: *Diss. Hannover* 1942 (19).
- (10) Jung, S.: *Zucht und Haltung*

Tab. 2. Vergleich des Krötentests und der Aschheim-Zondek-Reaktion mit unvorbehandeltem und vorbehandeltem Harn

Untersuchungsstoffe und -methode	positiv	negativ
Krötentest mit unvorbehandeltem Harn	42 (30,9%)	94
Aschheim-Zondek-Reaktion mit unvorbehandeltem Harn	55 (40,4%)	81
Krötentest mit vorbehandeltem Harn	45 (33,1%)	91

der wichtigsten Laboratoriumsversuchstiere. (Jena 1958).

- (11) Klopfer, A., H. Frank: Ref. Dtsch. med. Wschr. 74 (1949), 1483.
 (12) Lilie, P., R. Hartleb: Geburtsh. u. Frauenheilk. 9 (1949), 651.
 (13) Lutz, O.: Münch. med. Wschr. 97 (1955), 1261.

- (14) Mannstein, B., F. Schmidt-Hoensdorf: Arztl. Forsch. 3 (1949), 53.
 (15) Müller, S.: Münch. med. Wschr. 93 (1951), 2.
 (16) Nishijima, G., N. Aya, K. Ishida, S. Shimada, S. Najima, T. Uemura: Yonago Acta med. 2 (1957), 119.

- (17) Oobatake, K.: World Obstet. Gynec. 2 (1950), 450 zit. n. H. Grote. Diss. Hannover 1951 (8).
 (18) Paul, H. Diss. Münster (Westf.) 1949.

- (19) Petzold, G.: Diss. Hannover 1942.
 (20) Schmidt-Elmendorff, H. R., C. L. Maschke: Med. Klin. 46 (1951) 1073.

(Anschr.: Dr. L. Hensel, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule, Hannover, Hans-Böckler-Allee 16)

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Bonn (Direktor: Prof. Dr. F. Tiemann)

Akute generalisierte Lymphadenopathie als Nebenwirkung bei thyreostatischer Therapie mit Perchlorat

Von Hans-Ludwig Krüskemper

Seit 1954 wird Perchlorat mit gutem klinischen Erfolg in der konservativen Therapie von Hyperthyreosen verwendet. Serienuntersuchungen bei einer Gesamtzahl von über 900 Patienten (5, 14, 18) ergaben eine sehr geringe Anzahl von Perchlorat-Nebenwirkungen; die relative Häufigkeit aller Nebenwirkungen liegt bei etwa 3%. Sie ist somit geringer als bei thyreostatischen Medikamenten der organischen Gruppe (Thiourazilderivate, Merkaptopimidazole). Neben der Seltenheit von Perchlorat-Nebenwirkungen überhaupt zeigte die klinische Beobachtung auch ein sehr viel schmaleres Spektrum der Nebenwirkungen bei qualitativer Analyse. Man hat im wesentlichen mit Unverträglichkeit seitens des Magen-Darm-Traktes und mit wahrscheinlich allergisch bedingten Hauterscheinungen zu rechnen. Es erscheint daher von Bedeutung, auf eine bislang unbekannte Nebenwirkung von Perchlorat, die akute generalisierte Lymphadenopathie, aufmerksam zu machen.

Es handelte sich um eine 17 Jahre alte Patientin, die wegen Verdachtes auf Hyperthyreose zur stationären Behandlung aufgenommen wurde. Sie klagte über Schlaflosigkeit, starken Bewegungsdrang, Herzklopfen, gesteigertes Schwitzen und Zunahme des Halsumfangs. 7 kg Gewichtsabnahme innerhalb von drei Monaten. Objektiv ergab sich eine konstante Tachykardie um 130/min. Blutdruck zwischen 130/60 und 115/50 mm Hg. Die Schilddrüse war mäßig diffus vergrößert; Schwirren und Rauschen waren nachweisbar. Der Grundumsatz war auf + 35% erhöht. Während einer Vorbeobachtungsperiode von 10 Tagen, in der Reserpin gegeben wurde, sank das Gewicht um weitere 2 kg; der Gesamtzustand blieb unverändert. Dann wurde die antithyreoidale Therapie mit Perchlorat in einer Tagesdosis von 1200 mg begonnen. Im Laufe der ersten 10 Behandlungstage begann die Pulsfrequenz zu sinken, der Gewichtsverlust kam zum Stillstand, das subjektive Befinden der Patientin besserte sich.

Am 12. Tag der Perchlorat-Behandlung trat plötzlich eine Temperatursteigerung auf 38° ein; am nächsten Morgen zeigte sich ein generalisiertes, nur mäßig juckendes, skarlatiniformes Exanthem, welches an den Streckseiten der Extremitäten und am Kopf am stärksten ausgeprägt war, außerdem ein Exanthem im Bereich der Mundschleimhaut und eine diffuse Rötung des Rachens. Die Körpertemperatur stieg weiter bis auf 39,8° an. Einen Tag später ergab die Untersuchung bei Fortbestehen des Fiebers und des Exanthems eine generalisierte Lymphknoten-Vergrößerung. Betroffen waren vor allem symmetrisch die nuchalen, retroaurikulären, supraklavikulären und axillären Lymphknoten. Auch die Milz wurde tastbar. Die Lymphome erreichten maximal Kirschgröße, sie waren nicht konfluierend, Druckschmerzhaftigkeit bestand kaum. Die subjektiven Beschwerden der Patientin waren auffallend gering, sie klagte lediglich über eine gewisse Schmerzhaftigkeit beim Schlucken auf Grund der diffusen Pharyngitis.

Da aus früheren Veröffentlichungen (2, 12, 16) bekannt war, daß Perchlorat Arzneimittel-Exantheme verursachen kann, wurde bereits am Tage des Auftretens des Exanthems die Perchlorat-Therapie abgebrochen. Außer der Medikation von Antihistaminika wurden zusätzliche therapeutische Maßnahmen nicht notwendig. Eine Woche nach Beginn des Fiebers war die Körpertemperatur normalisiert, das Exanthem verschwunden; weitere fünf Tage später konnten keine Lymphome mehr getastet werden.

Laboruntersuchungen: Harnbefund stets normal; Blutkörperchensenkung vor Eintritt der Reaktion: 5/11 n. W.; am 2. Tag: 6/15; am 9. Tag: 4/11; am 17. Tag: 4/16. Blutbild: Haemoglobin um 78% schwankend, Erythrozyten um 4 Millionen/cmm. Leukozyten: vor Perchlorat-Behandlung: 6600, 5000; während der Behandlung: 5800; nach Beginn des Fiebers (bei täglicher Zählung): 6000, 6800, 6000, 5100, 4000, 5400, 7000, 6000. Die ebenfalls täglich durchgeführte Differenzierung ergab bis auf eine Eosinophilie von 5–6% (einsetzend drei Tage nach Beginn des Fiebers) keine Besonderheiten; die relative Lymphozytenzahl betrug maximal 35%. Röntgenologisch normaler Thoraxbefund, vor allem kein Hinweis auf Hiluslymphknoten-Beteiligung. Im EKG normaler Erregungsablauf. Serologische Untersuchungen auf Listeriose, Toxoplasmose, Brucellose, Ornithose waren ebenso negativ wie die mehrfach kontrollierte Paul-Bunnell-Reaktion.

Die Annahme, wonach das hier beschriebene Syndrom eine Nebenwirkung von Perchlorat darstellt, wurde durch den weiteren Verlauf bestätigt. Bei der gleichen Patientin begann einige Monate später ein leichtes Rezidiv der Hyperthyreose. Die Kranke erhielt erneut Perchlorat. Am 16. Tag der zweiten Behandlungsperiode trat wiederum ein Exanthem auf das der Form nach völlig dem der Erstbeobachtung entsprach. Lymphknotenvergrößerungen fehlten, vielleicht weil sofort mit einer hochdosierten Medikation von 6-Methylprednisolon, unter der nach drei Tagen das Exanthem verschwand, begonnen wurde. Die Patientin wurde schließlich einer subtotalen Thyreoidektomie unterzogen.

Besprechung

Bei Nebenwirkungen von Medikamenten hat man im wesentlichen drei Möglichkeiten der Genese zu unterscheiden: 1. Intoleranzsymptome, 2. toxische Erscheinungen und 3. allergisch bedingte Nebenwirkungen.

Vom Perchlorat sind bislang nur Nebenwirkungen der ersten und dritten Gruppe bekannt geworden: Erbrechen, Übelkeit und Oberbauchbeschwerden als Zeichen der Unverträglichkeit und Exantheme der verschiedensten Form als Symptom einer allergischen Hautreaktion. Auch drei unter Perchlorat-Therapie beobachtete gutartig verlaufende Leukopenien dürften, soweit sie überhaupt mit der Perchlorat-Medikation in Beziehung stehen (13), allergischen Ursprungs sein (4, 8). Als toxisch anzusprechende Nebenwirkungen von Perchlorat wurden weder klinisch noch im Tierversuch beobachtet (11).